

# 阿卡波糖发酵代谢阶段性溶氧控制的研究与应用

黄建平, 郑燕(杭州中美华东制药有限公司, 杭州 310000)

**摘要:** 目的 研究摇瓶发酵不同阶段含氧量变化对阿卡波糖工业生产菌种犹他游动放线菌阿卡波糖合成的影响, 以建立溶氧控制策略提高其阿卡波糖发酵水平。方法 通过调整摇瓶转速以及降低补料浓度和增加补料量调控溶氧水平, 确定发酵过程中溶氧控制对犹他游动放线菌阿卡波糖发酵水平的影响。结果 建立了基于提高发酵后期摇床转速并同时降低补料浓度的溶氧控制策略, 阿卡波糖效价达到  $8\ 307\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 较对照组提升了 11.98%。结论 通过溶氧控制可以明显提高犹他游动放线菌阿卡波糖发酵水平, 结果为进一步提高阿卡波糖工业发酵水平和降低生产成本提供了基础。

**关键词:** 阿卡波糖; 发酵; 溶氧控制; 优化

中图分类号: R977.1+5

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2020)17-2114-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.17.012

引用本文: 黄建平, 郑燕. 阿卡波糖发酵代谢阶段性溶氧控制的研究与应用[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(17): 2114-2118.

## Research and Application of Dissolved Oxygen Control in Acarbose Fermentation

HUANG Jianping, ZHENG Yan(Hangzhou Zhongmei Huadong Pharmaceutical Co., Ltd., Hangzhou 310000, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish a dissolved oxygen(DO) control strategy and further improve the acarbose titer, investigate the effect of DO concentration changes in various stages of shake flask fermentation on acarbose synthesis of *Actinoplanes utahensis*. **METHODS** By adjusting the rotation speed of shaker, reducing the feed concentration and increasing the feed dosage, the DO concentration was regulated and then the effect of DO control strategy on the acarbose titer by *Actinoplanes utahensis* was determined. **RESULTS** A DO control strategy was established by simultaneously increasing the rotation speed and reducing the feed concentration in the later fermentation stage. With the established strategy, the maximum acarbose titer reached  $8\ 307\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  which was 11.98% higher than that of the control group. **CONCLUSION** Efficient DO regulation can significantly improve acarbose titer of *Actinoplanes utahensis*. These findings provide support for further improving the acarbose fermentation and reducing the production costs.

**KEYWORDS:** acarbose; fermentation; dissolved oxygen control; optimization

II型糖尿病是我国重大多发性疾病, 患者已超过 1.17 亿人, 故高效治疗药物需求巨大<sup>[1]</sup>。阿卡波糖是一种复合低聚糖, 是游动放线菌经次级代谢产物, 被广泛用于II型糖尿病的预防和治疗<sup>[2]</sup>。阿卡波糖不仅具有明显的降血糖作用, 还能够显著降低糖耐量异常(糖尿病前驱)转为糖尿病的风险<sup>[3]</sup>, 并能有效预防糖尿病导致的心血管并发症, 而且安全性高, 自上市以来便成为治疗II型糖尿病的理想药物<sup>[4]</sup>。另外, 阿卡波糖联合门冬氨酸鸟氨酸可以有效降低血氨和内毒素, 改善肝性脑病症状, 并起到保护肝脏和大脑的作用<sup>[5]</sup>。因此提高阿卡波糖发酵水平, 降低生产成本, 提高产能, 才能不断扩充市场占有率, 创造良好的经济和社会效益。

目前, 除菌种改良外<sup>[6]</sup>阿卡波糖发酵工艺的研究主要围绕基础配方的调整、补料配方的优化以

及发酵过程控制与优化等方面进行<sup>[7-8]</sup>。在调整基础配方方面, 研究者确定了葡萄糖和麦芽糖的最适比例以及最佳的复合氮源比例<sup>[9]</sup>。在发酵过程控制与优化方面, 研究者通过控制不同阶段发酵液的渗透压, 提高了阿卡波糖发酵水平<sup>[10]</sup>。本研究从优化发酵控制条件出发, 通过降低摇床转速适当降低发酵前期溶氧水平, 并将摇床转速提高12%或者降低补料浓度提高发酵后期溶氧水平, 以改善发酵后期溶氧状况, 初步探索控制溶氧水平对发酵后期效价的影响, 为提升发酵水平奠定基础, 同时为中试放大试验中的溶氧控制方法提供支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种** 阿卡波糖生产菌: 犹他游动放线菌(*Actinoplanes utahensis*), 由杭州中美华东制药有

作者简介: 黄建平, 男 Tel: (0571)61071580 E-mail: 43293531@qq.com

限公司保存。

**1.1.2 仪器** Systec HX-150 脉动真空灭菌柜(德国 Systec GmbH); HWS-270M 恒温培养箱(宁波东南仪器有限公司); ZHJH-C1115B 超净工作台(上海智城分析仪器制造有限公司); BLBIO-HYG-FJ2 摇床机(上海百仑生物科技有限公司); S20 pH 计(瑞士 Mettler Toledo 公司); SNB-3SNB-3 黏度计(上海尼润智能科技有限公司); FC5706 离心机(美国 Ohaus 公司); Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司)等。

**1.1.3 培养基** 斜面培养基: 黄豆粉 2%; 土豆淀粉 1%; 葡萄糖 2%;  $\text{CaCO}_3$  0.15%; 琼脂 1.5%; pH 7.0, 121 °C 高压灭菌 30 min。

种子培养基: 黄豆粉 2%; 土豆淀粉 2%; 葡萄糖 2%;  $\text{CaCO}_3$  0.2%; pH 7.0, 121 °C 高压灭菌 30 min。

发酵培养基: 麦芽糖粉 4%; 葡萄糖 3%; 黄豆饼粉 2%; 味精 0.5%;  $\text{CaCl}_2$  0.35%;  $\text{CaCO}_3$  0.25%;  $\text{FeCl}_3$  0.05%;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1%; pH 7.0, 121 °C 高压灭菌 30 min。

补料培养基: 葡萄糖 30%; 麦芽糖粉 10%; 黄豆粉 2%; pH 7.0, 121 °C 高压灭菌 30 min。

## 1.2 方法

**1.2.1 种子培养** 用接种铲挖取 0.5 cm×1.0 cm 大小的斜面培养物(单菌落在温度 28 °C 下培养 7 d), 接种于装有 100 mL 种子培养基的 500 mL 三角瓶中, 28 °C 在摇床上振荡(250 r·min<sup>-1</sup>)培养 48 h, 制得种子培养液。

**1.2.2 发酵培养** 在接种前, 首先将灭菌后的  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  加入到发酵培养基中, 并振荡均匀。将上述种子培养液按 10% 接种量接至装有 30 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中, 30 °C 振荡(250 r·min<sup>-1</sup>)培养 7 d, 每组补料体积为 3 mL。每个处理 3 次重复。

**1.2.3 数据分析** 菌体浓度(PCV%)的测定: 取发酵液 10 mL 于离心管中, 3 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 7 min, 将上清液倒入另一 10 mL 离心管中, 测定上清液的体积。

$$\text{菌体浓度}(\%) = \frac{10 - V_{\text{上清液}}}{10} \times 100\%$$

溶氧浓度分析: 摇瓶溶氧水平用溶氧电极(瑞士 Mettler Toledo 公司)监测。

阿卡波糖含量的测定: Agilent 1260 高效液相色谱仪, 色谱柱为 Luna NH<sub>2</sub> 100A 柱(150 mm×

4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-磷酸盐缓冲液(70 : 26), 流速 1.5 mL·min<sup>-1</sup>, 波长 210 nm, 温度 40 °C。

## 2 结果与分析

**2.1 摇床转速对犹他游动放线菌阿卡波糖发酵水平的影响**

摇床转速对摇瓶中的溶氧水平有一定的影响, 因此可通过控制摇床转速来间接控制摇瓶中的溶氧水平。通过降低发酵前期摇床转速和提高发酵后期摇床转速, 考察溶氧水平的变化对发酵水平的影响。

**2.1.1 降低前期转速对阿卡波糖发酵水平的影响** 发酵前期, 菌丝量较少, 发酵液菌体浓度及黏度还未达到峰值。为了考察降低发酵前期摇床转速是否能满足菌丝体的溶氧需求, 设置 3 组试验。

对照组将摇床转速全程按 250 r·min<sup>-1</sup> 进行; 试验一组和试验二组分别将发酵前期摇床转速由 250 r·min<sup>-1</sup> 降低至 150 r·min<sup>-1</sup> 和 200 r·min<sup>-1</sup>, 后期转速又恢复至 250 r·min<sup>-1</sup>。摇床转速调整后, 其对溶氧、阿卡波糖发酵水平以及犹他游动放线菌生物量的影响分别见图 1~3。

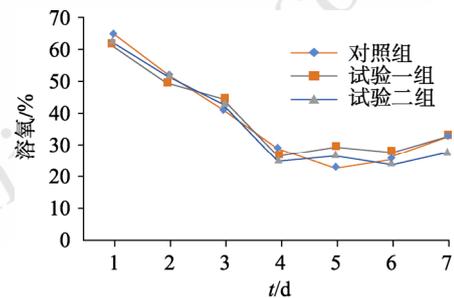


图 1 发酵前期调整摇床转速对溶氧水平的影响  
Fig. 1 Effect of shaker rotation speed adjustment in early stage of the fermentation on dissolved oxygen level

降低发酵前期摇床转速后, 发酵中期溶氧水平略高于对照组, 前期效价与对照组相比虽有所下降, 但是每天仍能保持一定的涨幅。在发酵 3 d 时将转速恢复至 250 r·min<sup>-1</sup>, 发现试验一组和试验二组在发酵中后期效价与对照组相当, 甚至在后期效价超过对照组。以上结果说明, 发酵前期通过降低摇床转速控制低水平的溶氧条件, 依然能维持发酵效价的生长。而发酵中后期将摇床转速恢复至正常水平时, 菌体发酵水平又能恢复到与对照组相当的水平甚至超过对照组, 说明控制低水平的溶氧可能会保留菌丝生长潜力, 有利于后期发酵水平提升。

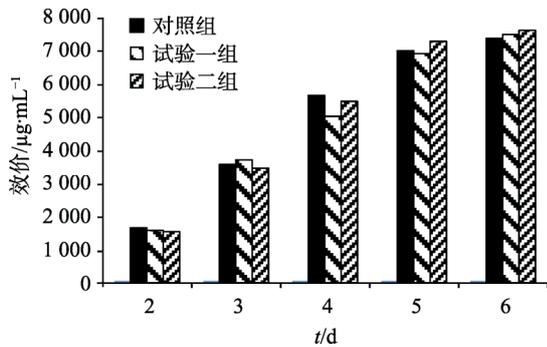


图2 发酵前期调整摇床转速对阿卡波糖发酵水平的影响  
Fig. 2 Effect of shaker rotation speed adjustment in early stage of the fermentation on acarbose fermentation level

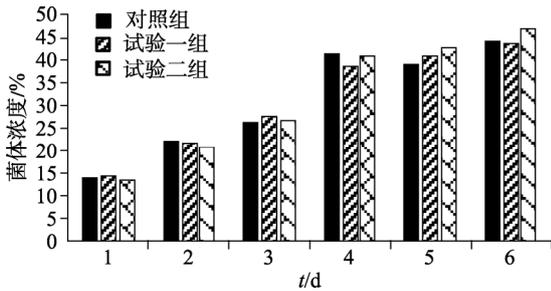


图3 发酵前期调整摇床转速对犹他游动放线菌生物量的影响  
Fig. 3 Effect of adjusting the shaker rotation speed in early stage of the fermentation on growth of *Actinoplanes utahensis*

2.1.2 提高后期转速对阿卡波糖发酵水平的影响

由于发酵后期，发酵液中菌体浓度升高，发酵液黏度增大，导致后期溶氧降低，影响菌体生长和代谢产物的积累。因此尝试通过提高发酵后期摇床转速，以提高后期溶氧水平，观察对发酵水平的影响，设置2个试验组。

试验三组在发酵后期将摇床转速由  $250 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  提高至  $280 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 。试验四组在发酵前期将摇床转速降低至  $200 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ，在发酵后期将转速提高至  $280 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 。2种调整策略对溶氧、阿卡波糖发酵水平和生物量的影响分别见图4~6。

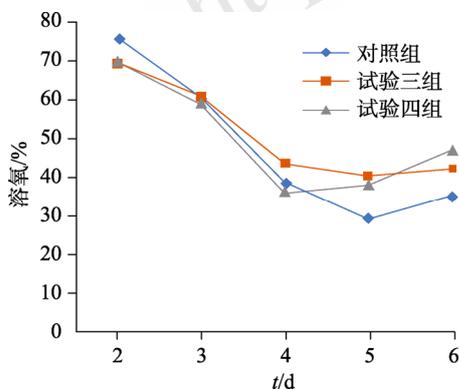


图4 发酵后期调整摇床转速对溶氧的影响  
Fig. 4 Effect of shaker rotation speed adjustment in late stage of the fermentation on dissolved oxygen level

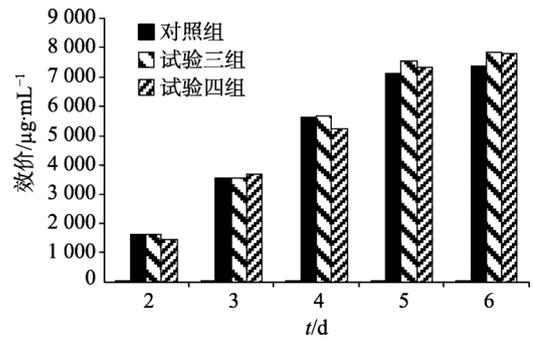


图5 发酵后期调整摇床转速对阿卡波糖发酵水平的影响  
Fig. 5 Effect of shaker rotation speed adjustment in late stage of the fermentation on acarbose fermentation level

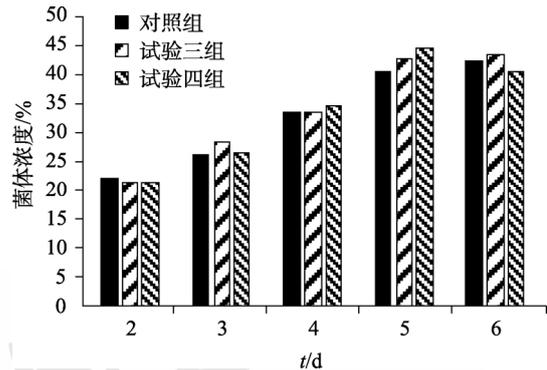


图6 发酵后期调整摇床转速对犹他游动放线菌生物量的影响  
Fig. 6 Effect of shaker rotation speed adjustment in late stage of the fermentation on growth of *Actinoplanes utahensis*

发酵后期提高转速，其溶氧水平皆高于对照组，结果见图4；试验三组在发酵4 d时提高摇床转速后，后期发酵水平均高于对照组，结果见图5。试验四组在前期调低转速，控制低水平溶氧，发酵水平可能略低于对照组。但是在后期提高转速后，发酵水平迅速回升，且后期发酵水平皆高于对照组。在发酵6 d时，发酵效价达到最高  $7822 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，阿卡波糖效价与对照组相比提升了6.04%。在4 d之后提高摇床转速，菌体浓度增长较明显，结果见图6。以上结果说明，通过提高摇床转速调高发酵后期的溶氧水平，对菌体生长有利，能促进发酵后期效价的生长。因此，在发酵后期需维持较高的溶氧水平以满足菌体生长代谢需要。

## 2.2 补料控制策略对阿卡波糖发酵水平的影响

阿卡波糖发酵过程中，发酵液中菌体浓度及黏度逐步升高，导致发酵后期溶氧下降，影响菌体生长及效价的提升。因此尝试通过降低补料浓度并增加补料体积来提高后期溶氧，观察对发酵水平和生物量的影响，试验结果分别见图7~9。

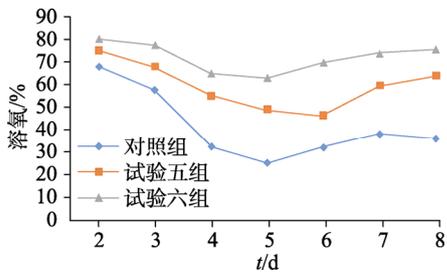


图7 降低补料浓度并增加补料体积对发酵罐溶氧的影响  
Fig. 7 Effect of reducing the feed concentration and increasing the feed dosage on dissolved oxygen level

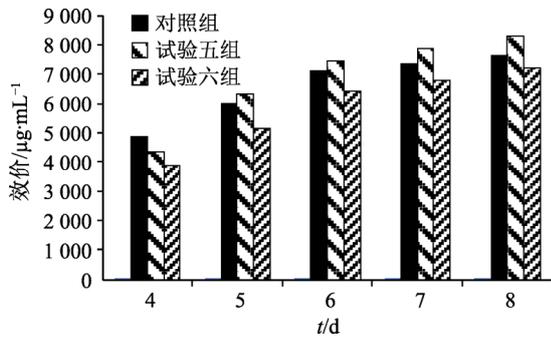


图8 降低补料浓度并增加补料体积对阿卡波糖发酵水平的影响  
Fig. 8 Effect of reducing the feed concentration and increasing the feed dosage on acarbose fermentation level

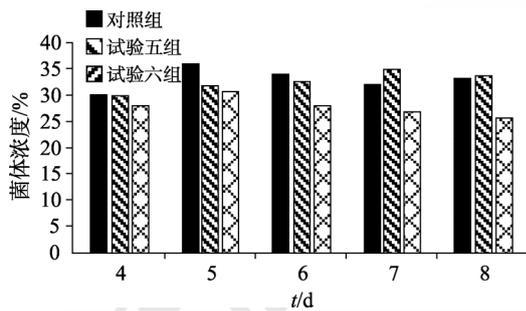


图9 降低补料浓度增加补料量对犹他游动放线菌生物量的影响  
Fig. 9 Effect of reducing the feed concentration and increasing the feed dosage on growth of *Actinoplanes utahensis*

降低补料浓度并增加补料体积提高了溶氧水平,结果见图7。试验五组为补料浓度稀释1.7倍、每档补5 mL后,阿卡波糖发酵水平在发酵后期均高于对照组,结果见图8。在发酵8 d时效价达到最高8 254  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,与对照组相比提高了8.35%。而将试验六组补料浓度稀释3.3倍、每档补10 mL后,阿卡波糖发酵水平与对照组相比显著降低,效价降低约5%。试验六组的生物量在后期一直维持下降的趋势,且显著低于对照组,结果见图9。以上结果说明,改变补料浓度与补料体积对发酵过程中的溶氧水平有一定的影响,适当降低补料浓度且提高补料量能缓解后期发酵液黏度大、溶氧不足的情况,有利于后期效价进一步提升。然而补料

浓度过低且补料体积过大,则导致最终放瓶体积过大,降低发酵水平。

### 2.3 降低补料浓度并提高后期摇床转速对阿卡波糖发酵水平的影响

由前期试验可知,降低补料浓度以及提高后期转速都能够提高发酵后期的溶氧水平,对阿卡波糖发酵水平有一定的促进作用。因此本试验尝试通过在降低补料浓度的同时提高发酵后期摇床转速,观察对阿卡波糖发酵水平和生物量的影响,试验结果分别见图10~12。

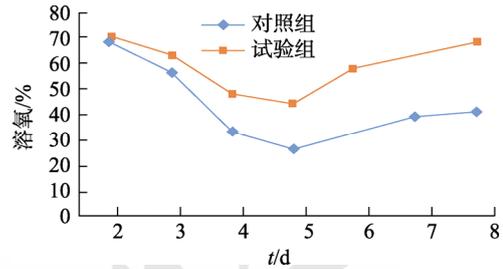


图10 降低补料浓度并提高转速后溶氧变化  
Fig. 10 Effect of reducing the feed concentration and increasing the rotation speed in late fermentation stage on dissolved oxygen level

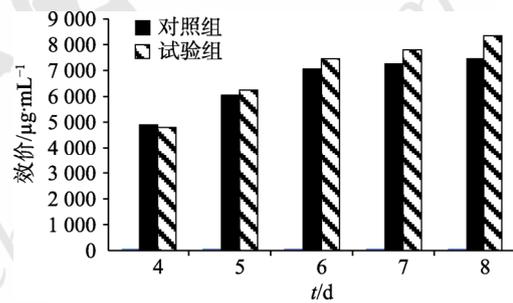


图11 降低补料浓度并提高发酵后期摇床转速后对阿卡波糖发酵水平的影响  
Fig. 11 Effect of reducing the feed concentration and increasing the rotation speed in late fermentation stage on acarbose fermentation level

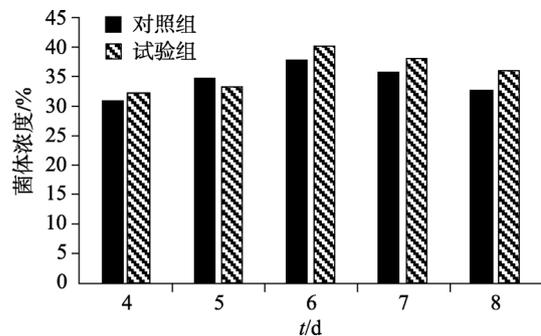


图12 降低补料浓度并提高摇床转速后对犹他游动放线菌生物量的影响  
Fig. 12 Effect of reducing the feed concentration and increasing the shaker rotation speed in late fermentation stage on growth of *Actinoplanes utahensis*

降低补料浓度同时提高发酵后期摇床转速,其溶氧水平显著提高,结果见图 10。试验组阿卡波糖发酵水平在后期均高于对照组,结果见图 11。且在发酵 8 d 时,效价达到最大  $8\ 307\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,并与对照组相比提高了 11.98%。同时,从图 12 中看出试验组的菌体浓度比对照组稍高,说明降低补料浓度同时结合后期摇床转速的提高,有利于提高发酵后期的溶氧水平,对阿卡波糖发酵水平的促进作用比较显著。

优化后的发酵效价已处于国内领先水平,为国内外报道的最高水平。本研究的应用将大幅提升阿卡波糖发酵水平,增加阿卡波糖的市场供应,同时降低生产成本,为市场提供更有竞争力的价格。

### 3 讨论

本研究在摇瓶发酵的基础上,探索了犹他游动放线菌发酵前期及后期对溶氧的不同需求。结果发现:①发酵过程中通过分阶段控制摇床转速来调控溶氧水平,能够减缓菌体的快速生长,延缓菌体衰老,维持后期效价的持续增长;后期将摇床转速提高 12%后,效价提升了 6.04%。②通过降低补料浓度并增加补料体积,能够降低后期发酵液黏度,提高溶氧量;将补料稀释 1.7 倍并增加补料体积至 5 mL,效价提升 8.35%。通过对以上影响发酵因素考察,筛选最佳组合后,最终实现效价由  $7\ 418\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  提高到  $8\ 307\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,幅度提升 11.98%。

本研究总结出的溶氧控制策略,实现了犹他游动放线菌阿卡波糖发酵水平的提升,并为在大型发酵罐放大试验提供技术支持。溶氧浓度作为阿卡波糖发酵控制中的一个关键参数,直接影响阿卡波糖发酵生产的稳定性和效益性。本研究发现在发酵前期可适当降低溶氧量,并确保该条件

下的溶氧依然能满足游动放线菌菌体生长代谢,等进入发酵中、后期阶段,需通过采取不同措施来提高发酵液中的溶氧量,从而让游动放线菌菌体代谢进入快速对数生长期,最终提高阿卡波糖的发酵水平。

### REFERENCES

- [1] WILLIAMS R, COLAGIURI S, ALMUTAIRI R, et al. IDF diabetes atlas [M]. 9th ed. International Diabetes Federation, 2019.
- [2] WEHMEIER U F, PIEPERSBERG W. Biotechnology and molecular biology of the  $\alpha$ -glucosidase inhibitor acarbose [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2004, 63(6): 613-625.
- [3] HOLMAN R R, COLEMAN R L, CHAN J C N, et al. Effects of acarbose on cardiovascular and diabetes outcomes in patients with coronary heart disease and impaired glucose tolerance (ACE): A randomised, double-blind, placebo-controlled trial [J]. Lancet Diabetes Endocrinol, 2017, 5(11): 877-886.
- [4] CHENG P, LI Y H, GUO R C. Progressin pharmacological research of acarbose and its clinical applications [J]. J Pharm Res(药学研究), 2020, 39(2): 107-110.
- [5] GU T M, ZHANG Y, JIANG Y P, et al. Efficacy of acarbose-linked ornithine aspartate in hepatic encephalopathy in cirrhotic patients [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2018, 35(10): 1538-1542.
- [6] ZHAO Q Q, LUO Y C, ZHANG X, et al. A severe leakage of intermediates to shunt products in acarbose biosynthesis [J]. Nat Commun, 11(1): 1468.
- [7] 夏焕章. 发酵工艺学[M]. 第 4 版. 北京: 中国医药科技出版社, 2019.
- [8] 陈喆明. 阿卡波糖发酵生产工艺研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2015.
- [9] GAO J H, HE J Y, TIAN W, et al. Influence of carbon sources on biosynthesis of acarbose [J]. J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报), 2004, 21(5): 385-388.
- [10] 姜玮. 阿卡波糖发酵工艺优化及渗透压对阿卡波糖发酵的影响[D]. 上海: 华东理工大学, 2009.

收稿日期: 2020-03-14  
(本文责编: 沈倩)